

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: **Biologie**

Studijní obor: **Biologie**



Kristina Sovová

Mikrobiota a protista ve střevech komárů a flebotomů

Microbiota and protists in the gut of sand flies and mosquitoes

Bakalářská práce

Školitel: Prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.05.2017

Podpis

Zde bych především chtěla poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Petrovi Volfovi, CSc., za jeho trpělivost, komentáře a především velkorysou pomoc při sepisování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře za milý přístup. Velmi děkuji Kačce Růžičkové, která se mě ujala a pomohla mi s prvním seznámením s laboratoří. Dále také děkuji sestře a rodičům, kteří mě neustále podporují.

Obsah

1	Abstrakt	5
2	Úvod	1
3	Zdroje mikrobioty a způsob přenosu bakterií u hematofágního hmyzu	2
3.1	Zdroje infekce u dospělých jedinců	2
3.2	Zdroje infekce u nedospělých stádií	3
3.3	Přenos bakterií mezi krevsajícím hmyzem	3
3.3.1	Transstadiální přenos	4
3.3.2	Transovariální přenos	5
3.3.3	Horizontální přenos	6
4	Bakteriální diverzita ve střevech komárů a flebotomů	6
5	Metody identifikace bakterií	8
5.1	Kultivační metody identifikace	9
5.2	Nekultivační metody identifikace	10
5.2.1	PCR-DGGE	10
5.2.2	PCR-TTGE	11
5.2.3	T-RFLP	11
5.2.4	Metagenomická analýza	12
6	Vliv mikrobioty na vývoj protist ve střevech komárů a flebotomů	13
6.1	Imunitní odpověď hmyzu proti patogenům	15
6.2	Vliv mikrobioty na kompetenci komárů vůči plasmodiím	16
6.3	Vliv mikrobioty na kompetenci flebotomů vůči leishmaniím	19
7	Závěr	23
8	Použitá literatura	25

1 Abstrakt

Flebotomové a komáři jsou přenašeči leishmanií a plasmodií, což jsou parazitární protista, která způsobují malárii a leishmaniózu. Komáři i flebotomové jsou vystaveni širokému spektru mikroorganismů, které se do jejich těla dostávají kontaktem s okolním prostředím, při příjmu potravy nebo přenosem z jedince na jedince. Larvy získávají mikroorganismy z mikrohabitatu líhnišť, dospělci z cukerné potravy a krve. Naprostá většina bakterií vyskytujících se v mesenteronu střeva dospělých přenašečů patří do skupiny gram negativních. U larválních stádií se však poměr gram pozitivních bakterií ve střevě zvyšuje. Ve střevě přenašeče se bakterie mohou setkávat s parazitárními protisty a ovlivňovat zde jejich vývoj přímo nebo nepřímo. Přímé ovlivnění může být způsobeno například produkcí sekundárních bakteriálních metabolitů. Nepřímo mohou bakterie modulovat kompetenci vektora přes jeho imunitní systém.

Klíčová slova: Phlebotomus, Lutzomyia, Leishmania, mikrobiom

Abstract

Sand flies and mosquitoes are vectors of leishmania and plasmodium, which are parasitic protists, that cause malaria and leishmaniasis. Mosquitoes and sand flies are exposed to a wide range of micro-organisms, which enter their bodies when they get in contact with the surrounding environment, when they intake food or via a transfer from individual to individual. The larvae acquire micro-organisms from breeding sites microhabitat, the adults from the sugary food and blood. The vast majority of the bacteria found in the mesenteron of adult vectors belongs to a group of gram negative. During the larval stages, however, the ratio of gram positive bacteria in the gut increases. In the gut, the bacteria can encounter parasitic protists and influence their development, directly or indirectly. Direct influence can be caused, for example, by the production of secondary bacterial metabolites. Indirectly, the bacteria can modulate the vector's competence over its immune system.

Key words: Phlebotomus, Lutzomyia, Leishmania, microbiom

2 Úvod

Leishmanie i plasmodia jsou jednobuněční parazité obratlovců, kteří u lidí způsobují závažná onemocnění. Jejich společným rysem je vývoj v hmyzím přenašeči, kterým je hematofágní dvoukřídlý hmyz. Podstatná část vývoje probíhá ve střevě přenašeče, kde v obou případech dochází i k pohlavnímu rozmnožování.

Leishmanie patří do řádu *Trypanosomatida* a tradičně se dělí na tři podrody- *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania*. Leishmanie jsou přenášeny flebotomy (Psychodidae, Phlebotominae), ti se rozdělují do tří hlavních rodů: - *Lutzomyia*, žijící v Novém Světě, a *Phlebotomus* a *Sergentomyia*, -vyskytující se ve Starém Světě.

Leishmanie se do těla flebotomů dostane spolu s nasátou krví a makrofágy nakaženého hostitele a do trávicího traktu vektora přichází ve formě tzv. amastigota. V lumen střeva, kde je nasátá krev obklopena peritrofickou matrix, dochází k transformaci amastigota na promastigota. Po rozpadu peritrofické matrix na posteriorním konci, promastigoti unikají anteriorním směrem k hlavové části flebotomů, kde se přichytí na stomodeální valvu a jsou připraveni, se během sání dostat do těla hostitele. Ve střevě dochází ke vzniku více forem promastigotů. Jedna z forem se nazývá metacyklický promastigot a je preadaptována na infekci obratlovčího hostitele (Bates, 2007; Kaye a Scott, 2011).

Plasmodia se řadí do třídy *Hematozoa* a jsou přenášena komáry (Culicidae). Parazitičtí Culicidae se dělí na podčeleď *Culicinae* a *Anophelinae*. *Culicinae* zahrnují, mimo jiné, rod *Culex*, který je přenašečem ptačích a plazích plasmodií, *Anophelinae* zahrnují zejména rod *Anopheles*, který je přenašečem savčích plasmodií.

Plasmodia vstupují do střeva přenašeče v podobě gametocytů, které jsou spolu s červenými krvinkami nasáty komárem z nakaženého hostitele. Z gametocytů (mikrogametocyt a makrogametocyt) vznikají gamety- 8 pohyblivých a nitkovitých samčích mikrogamet a jedna samičí makrogameta. Díky pohlavnímu rozmnožování v lumen střeva dochází ke vzniku pohyblivé zygoty (ookinet). Ookinet uniká z krve obklopené peritrofickou matrix a putuje až pod bazální membránu střeva, kde se encystuje na oocystu. V oocystě vznikají sporozoiti. Následně dochází k prasknutí oocysty a tyto sporozoiti migrují do slinných žláz přenašeče, odkud jsou během sání komára inokulováni do těla hostitele (Josling a Llinás, 2015).

Způsob života a získávání potravy z různých zdrojů je u hematofágního hmyzu doprovázen všudypřítomnými mikroorganismy, které mohou kolonizovat různé části trávicí soustavy nebo povrch těla přenašečů. V této práci shrnuji konkrétní zdroje bakteriální infekce komárů a flebotomů, složení jejich střevní mikrobioty, různé metody identifikace střevního mikrobiomu a v neposlední řadě mechanismy vlivu bakterií na vývoj protist v těchto přenašečích.

3 Zdroje mikrobioty a způsob přenosu bakterií u hematofágního hmyzu

Infekce hematofágního dvoukřídlého hmyzu mikroorganismy, ať už symbiotickými nebo patogenními, pochází z různých zdrojů, neboť různá vývojová stadia tohoto hmyzu žijí v rozdílném prostředí a živí se různorodou potravou.

3.1 Zdroje infekce u dospělých jedinců

Potravou dospělých samců i samic komárů a flebotomů je cukr, zajišťující dostatek energie. Samice obvykle sají i krev obratlovčího hostitele, která slouží jako bohatý zdroj proteinů ke kladení vajec. Sání na hostiteli je také jedním ze způsobů jak se mohou dospělci infikovat mikroorganismy. Například *Lutzomyia evansi* získává širokou škálu bakterií z lidské kůže stejně tak, jako ze zvířat nebo rostlin (Dillon et al., 1996). Existují ale i některé druhy hmyzu (např. někteří komáři nebo muchničky), jejichž samice nemusí sát krev, aby dokončily první gonotrofický cyklus, neboť využívají proteinové zásoby, které nastrádaly během vývoje larvy (dochází k nakladení tzv. autogenní snůšky).

Častým zdrojem cukru dospělých jedinců komárů a flebotomů je medovice, tvořená výměšky červců a mšic. Konkrétní trisacharid, který je ve velkém množství zastoupen právě v medovici se nazývá melezitóza (Burkett et al., 1998; MacVicker et al., 1990; Moore et al., 1987). Dalším důležitým zdrojem sacharidů pro obě skupiny jsou tkáně rostlin- nejčastěji listy či stonky (Schlein a Muller, 1995). Flebotomové navštěvují rostliny, jejichž nadzemní části jsou přirozeně kolonizovány širokým spektrem mikroorganismů a při nabodnutí listů a stonků mohou tyto mikroorganismy požrít do trávicí trubice (Schlein a Jacobson, 1999).

Komáři i flebotomové obou pohlaví mohou taktéž konzumovat nektar na květech či povrchu rostlin. Dalším zdrojem cukrů může být například fermentované ovoce. (Mueller et al., 2011).

3.2 Zdroje infekce u nedospělých stádií

Nedospělá vývojová stadia u flebotomů, larvy čtyř instarů a kukly, žijí v půdě. Půdní mikrohabitaty, označované jako líhniště flebotomů, se často nacházejí pod přístřešky domestikovaných zvířat nebo v norách hlodavců, kde se larvy živí nejčastěji zvířecím trusem a půdním detritem. Tyto místa jsou bohatým zdrojem různých mikroorganismů, které nedospělá stadia přijímají do trávicí soustavy spolu s potravou. Například larvy flebotomů rodu *Lutzomyia* mohou konzumovat, kromě trusu, i rostlinný materiál, který podléhá mikrobiální biodegradaci (Sant'Anna et al., 2012). Charakteristická líhniště pro flebotomy rodu *Lutzomyia* a *Brumptomyia* jsou místa s rozkládajícím se listím nebo ovocem a zároveň to mohou být oblasti, která jsou pod stromy chráněna před silným slunečním zářením a deštěm (Vivero et al., 2015).

Mikroorganismy mohou též hrát podstatnou roli ve výběru líhnišť flebotomů, neboť jejich metabolity lákají samice ke kladení vajec (Wasserberg a Rowton, 2011). Konkrétně u *Lutzomyia longipalpis* bylo dokázáno, že sloučeninou bakteriálního původu, ovlivňující gravidní samice, je *2-methyl-2-butanol* (Dougherty et al., 1995).

Životní cyklus komárů je vázán na vodní prostředí, neboť všechna nedospělá vývojová stadia potřebují ke svému vývoji vodu. Larvy komárů jsou filtrátory, kteří se živí např. detritem nebo mikroskopickými organismy. Takto přichází do kontaktu s mnoha bakteriemi, které mohou přijímat spolu s potravou. Střevní mikrobiota je esenciální pro správný a rychlý vývoj komárů (Coon et al., 2014). Při vývoji larev nezáleží tolik na konkrétních bakteriálních druzích, ale spíše na přítomnosti střevního bakteriálního společenství obecně (Coon et al., 2016). Bohatost vodních habitatů larev se odráží ve variabilitě kompozice střevní mikrobioty u dospělých jedinců. Larvy stejného druhu, vyvíjející se v odlišných vodních prostředích, vykazují různorodé složení střevních bakterií u dospělců (Boissière et al., 2012).

3.3 Přenos bakterií mezi krevsajícím hmyzem

K přenosu bakterií může docházet různými mechanismy. Mezi mechanismy přenosu patří transstadiální přenos- tedy přenos napříč stadii hmyzu a přenos horizontální,

neboť i mezi různými jedinci může docházet k infekci. Dalším způsobem přenosu je přenos transovariální.

3.3.1 Transstadiální přenos

Transstadiální přenos mikroorganismů je běžný u roztočů, klíšťat a hmyzu s proměnou nedokonalou. U hmyzu s přeměnou dokonalou (Holometabola) je transtadiální přenos komplikován odlišnou fyziologií a potravními nároky různých životních stádií. Komáři a flebotomové patří, společně s ostatním dvoukřídlym hmyzem, do hmyzu s přeměnou dokonalou a tudíž mají ve svém životním cyklu pupální stádium.

Kukla hraje velkou roli v transstadiálním přenosu bakterií, neboť v ní probíhá mnoho dynamických dějů spojených s přestavbou tělního plánu. Orgány a tkáně larvy jsou lyzovány a po určité době se z tohoto "lyzátu" formují tkáně a orgány dospělých stádií. Navíc se v kukle vytváří tzv. meconiální peritrofická matrix, která je odlišná od peritrofické matrix dospělců i larev, a která obklopuje meconium. Meconium je pozůstatek lyzovaného epitelu mesenteronu larev, který není kukla schopná vyloučit. Dvě hypotézy vysvětlující funkci komplexu meconiální matrix a meconia shrnuli (Moll et al., 2001). První hypotéza nahlíží na meconiální komplex jako na bariéru, která během metamorfózy chrání jedince hmyzu před potenciálně ohrožujícími mikroorganismy vyskytující se ve střevě larev. Druhá předpokládá, že meconiální matrix může chránit nově vznikající epitel mesenteronu před hydrolytickými enzymy spojenými s autolytickým rozpadem meconia (Moll et al., 2001)

Larvální mikrobiota získaná s potravou z prostředí, ve kterém larvy žijí, osidluje mesenteron. U *Phlebotomus duboscqi* bylo popsáno, že počty jednotlivých bakterií ve střevě se během vývoje larvy postupně zvyšují. Ve čtvrtém larválním stádiu, těsně před konečnou defekací, je množství bakterií největší. Před kuklením, po finální defekaci celého střevního obsahu dochází k rapidní redukci jak v počtu, tak v diverzitě bakterií (Moll et al., 2001; Volf et al., 2002).

Během metamorfózy v dospělce dochází k mechanismu "sterilizace" střeva. Tento mechanismus je poměrně účinný a zahrnuje sekvestraci rozpadající se larvální střevní tkáně i mikroflóry uvnitř meconia (shrnutí v Moll et al., 2001). Meconium je poté v rámci několika hodin po vylíhnutí z kukly vyloučeno.

Proces metamorfózy má vliv na diverzitu střevní mikroflóry. Většina mikrobioty, "nastřádaná" během larválního vývoje, je ztracena. Navzdory střevní "sterilizaci" - ale

dochází k tomu, že některé druhy bakterií setrvávají v jedinci napříč stádií a redukce střevní mikrobioty tak nemusí být úplná. Ty bakterie, které přežijí vylíhnutí z kukly, pokračují v rekolonizaci střeva dospělého. Například skupiny bakterií *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* a *Spirochaetes* jsou přítomny jak ve střevech raných stádií larev, tak ve střevech nově vylíhnutých dospělců *Culex tarsalis* (Duguma et al., 2015).

U komárů rodu *Mansonia*, *Culex*, *Aedes* a *Anopheles* sbíraných v Keňi byl dokázán transstadiální přenos bakterie *Aeromonas* spp. (Osei-Poku et al., 2012). Další bakterií nalezenou napříč všemi stádií *Culex tarsalis* je *Thorsellia* (Duguma et al., 2015). Transstadiální přenos této bakterie u komára *An. gambiae* je zřejmě jediným způsobem, jak se *Thorsellia* dostane do střev dospělého jedince. A autoři proto navrhuji, že se tato bakterie do střev komárů dostává spolu s larvální potravou a k jejímu příjmu již nedochází po metamorfóze z kukly na dospělého jedince (Briones et al., 2008). Příkladem transstadiálního přenosu u flebotomů, je přenos bakterií, pojmenované jako *AK*, které se vyskytovaly u různých stádií *Phlebotomus dubosqi* (Volf et al., 2002).

3.3.2 Transovariální přenos

Infikovaná samice přeneší do své snůšky vajíček i některé bakterie. Je zde ale podmínka, že bakterie musí být přítomna i v rozmnožovacím traktu hostitele. Příkladem transovariálně přenosné bakterie je *Asaia* sp. u komára *Anopheles Gambiae*, která kromě střeva osidluje i rozmnožovací soustavu (Damiani et al., 2010).

Zvláštní případ transovariálního přenosu je přenos zástupců intracelulárních α -proteobakterií rodu *Wolbachia*. *Wolbachia* je schopná manipulovat hmyzím hostitelem pomocí různých mechanismů, čímž ovlivňuje jeho schopnost reprodukce. Příkladem těchto mechanismů je cytoplazmatická inkompatibilita způsobující letalitu potomků (neschopnost produkovat životaschopné potomky). Cytoplazmatická inkompatibilita je založena na principu rozdílného cytoplazmatického obsahu pohlavních buněk (Kageyama et al., 2012). K letální cytoplazmatické inkompatibilitě dochází, když se kříží infikovaný samec s neinfikovanou samicí nebo se kříží s infikovanou samicí nakaženou jiným druhem *Wolbachia*. V případě, že se spolu páří infikovaná samička a neinfikovaný sameček, k inkompatibilitě nedochází a *Wolbachia* je přenesena transovariálním přenosem na potomstvo. Tento typ přenosu v kombinaci s cytoplazmatickou inkompatibilitou zajišťuje významný nárůst infikovaných jedinců. Prevalence infekce při křížení nakažených samic a neinfekčních samců *Phlebotomus*

papatasi byla u F3 generace potomstva o 30% vyšší než je tomu u F1 generace (Kassem a Osman, 2007). Tento fakt potvrzuje výhody životní strategie těchto α -proteobakterií.

3.3.3 Horizontální přenos

Tento typ přenosu umožňuje infekci mezi různými jedinci komárů či flebotomů v populaci. Například u *Anopheles gambiae* bylo popsáno, že dospělý jedinec byl schopen přenést bakterii z vody, ve které se vylíhl, do vody, kam později kladl vajíčka, čímž mohl nakazit i ostatní jedince nacházející se v místě jeho výskytu (Lindh et al., 2008).

4 Bakteriální diverzita ve střevech komárů a flebotomů

Ve střevech komárů a flebotomů se nachází široké spektrum bakterií, které je během jejich života získáváno různými způsoby, ať už k infekci dochází při konzumování potravy či při přenosu mezi jedinci. Složení bakteriálního společenství je ovlivňováno různými faktory.

Důležitý vliv na střevní diverzitu bakterií má lokalita výskytu flebotomů a komárů. Larvy získávají bakterie ze svého okolí s potravou. Tyto bakterie jsou u flebotomů identifikovatelné z půdy jejich líhnišť, v případě komárů z vodního prostředí. Při porovnání množství bakterií a míry jejich diverzity mezi jedinci a vývojovými stádii obecně platí, že diverzita ve střevě larev je různorodější, než je tomu u dospělců (Akhoundi et al., 2012; Vivero et al., 2016).

Velkou roli hraje i geografický původ jedinců. U *Anopheles gambiae* byla u jedinců pocházejících z různých oblastí, zjištěna překvapivě vysoká bakteriální diverzita. Většina identifikovaných bakterií se vyskytovala pouze u malého počtu jedinců a 80% jedinců vzájemně sdílelo pouze 20 identifikovaných bakteriálních rodů. Tato diverzita byla vysvětlena rozdílným vodním prostředím, ve kterém jedinci daných populací konzumovaly s potravou odlišné bakterie (Boissière et al., 2012).

Bakteriální flora se také lišila u jedinců *Lutzomyia evansi*, pocházejících z rozdílných oblastí Karibského pobřeží, což autoři přisuzují právě odlišné fauně a flóře prostředí (Vivero et al., 2016). Podobné složení bakteriálního společenství mají naopak jedinci stejného druhu, kteří se vyskytují ve stejné lokalitě. Tento fakt byl popsán u *Phlebotomus argentipes* z endemických částí Indie (Hillesland et al., 2008).

Různé druhy komárů a flebotomů se mohou vyskytovat ve stejné lokalitě, tudíž bychom předpokládali podobné mikrobiální složení mezi těmito druhy. Podobné mikrobiální složení bylo výsledkem porovnání u flebotomů *Phlebotomus papatasi*, *P. sergenti*, *P. kandelakii*, *P. perfiliewi* a *P. halepensis* ze Severozápadní oblasti Íránu (Akhoundi et al., 2012). Efekt lokality však nemusí být absolutní. U komárů se střevní mikroflóra může navzájem odlišovat. Rozdílné složení bakteriálního společenství získaného z jedné oblasti bylo například dokázáno u druhů komárů *Culex pipiens* a *Culex restuans* (Muturi et al., 2016).

Náznak určitých bakteriálních symbiotických vztahů s konkrétním druhem komára byl prokázán u *Anopheles culicifacies*, kdy u jednotlivých izolátů střevní bakteriální mikroflóry byly pozorovány jisté podobnosti i navzdory tomu, že izoláty pocházely z odlišných lokalit a vývojových stádií. Autoři z toho vyvozují, že bakterie nejsou tímto komárem získávány náhodně, ale naopak poukazují na možnou evoluční co-adaptaci, která může mezi druhy bakterií a druhy komárů či jejich líhništi probíhat (Chavshin et al., 2014).

Jedním z faktorů ovlivňujících střevní mikrobiotu komárů i flebotomů je sání krve dospělými samičkami. Krev ve střevě samic poskytuje bakteriím prostředí, ve kterém se rychleji a lépe množí. U komárů to bylo konkrétně dokázáno u bakterie rodu *Thorsellia*, které fyziologická adaptace umožňuje využít krev ke zvýšení své růstové rychlosti, což potvrzují kultivace na živném médiu buď s přítomností nebo bez přítomnosti 6% krve (Briones et al., 2008). U flebotomů bylo popsáno, že nejvyšší počty bakterií se objevují dva dny po nasátí samic. Tento jev nejspíš souvisí s nově přijatým množstvím proteinů, které jsou v trávené krvi obsaženy. Poté je část bakterií vydefekována spolu se zbytky strávené krve a jejich množství ve střevě dospělce opět klesá (Volf et al., 2002). U *Lutzomyia longipalpis* bylo ale zjištěno, že biodiverzita bakterií ve střevech flebotomů po nasátí krve klesá (Kelly et al., 2017). Z obou studií tedy můžeme vyvodit, že bakteriální počty po nasátí krve se sice zvyšují, avšak diverzita bakterií naopak klesá.

U všech vývojových stádií ve střevech komárů a flebotomů převažují gram negativní bakterie. Dominance této skupiny bakterií byla potvrzena u komárů (Djadid et al., 2011; Osei-Poku et al., 2012; Straif et al., 1998; Wang et al., 2011) i u flebotomů (Maleki-Ravasan et al., 2013; Monteiro et al., 2016). U komárů je nejmenší poměr gram negativních bakterií u larev, a v průběhu vývoje se tento poměr zvyšuje, tudíž u dospělců je dominance gram negativních bakterií nejsilnější (Chavshin et al., 2014; Vivero et al., 2016; Wang et al., 2011).

Menší část mikrobiomu tvoří gram pozitivní bakterie. Na rozdíl od gram negativních bakterií, které jsou majoritně identifikovatelné ve všech vývojových stádiích, u gram-positivních bakterií se zastoupení výrazně mění během vývojového cyklu hostitele. Gram pozitivní bakterie jsou většinou izolovány pouze ze střev larev nebo nově vylíhlých jedinců. U flebotomů jsou gram pozitivní bakterie asociovány s mikrohabitaty líhnišť (Wasserberg a Rowton, 2011). U *Lutzomyia evansi* byly izolovány i ze stádia kukly. Jejich počet a druhové zastoupení spolu s vývojem klesá, tudíž u pár dní starých dospělců je jejich zastoupení téměř nulové (Chavshin et al., 2014; Vivero et al., 2016).

Jednotliví zástupci výše zmíněného hematofágního dvoukřídlého hmyzu mohou sdílet určité rody bakterií, což znamená, že jeden rod bakterie se může vyskytovat u různých vektorů. Nejběžnější skupinou bakterií vyskytujících se jak u komárů tak flebotomů jsou gram negativní bakterie ze skupiny *Enterobacteriaceae*. U *Phlebotomus argentipes* jsou tyto bakterie získané z dobytčích výkalů (Hillesland et al., 2008).

Do skupiny *Enterobacteriaceae* patří i rod *Pseudomonas*, který je opakovaně identifikován ve střevech komárů i flebotomů z různých oblastí. Tyto bakterie byly identifikovány napříč Asií a Amerikou, jsou přenášeny transstadiálně a tudíž jsou v komárovi přítomny po celou dobu jeho vývoje (Gonzalez-Ceron et al., 2003; Pumpuni et al., 1993; Terenius et al., 2008).

Bakterie rodu *Pseudomonas* byla identifikována i ze střev *Lutzomyia longipalpis* (Peterkova-Koci et al., 2012), *Phlebotomus papatasi* (Dillon et al., 1996), *Phlebotomus dubosqui* (Volf et al., 2002) a *Phlebotomus argentipes* (Hillesland et al., 2008). Z gram pozitivních bakterií je nejčastěji nacházen *Bacillus subtilis*, vyskytující se například u *Phlebotomus perniciosus* (Fraihy et al., 2017), či u *Lutzomyia longipalpis* (Heerman et al., 2015).

Příkladem bakterie, vyskytující se u více druhů komárů, je *Thorsellia*. Fyziologie této bakterie je adaptovaná na život uvnitř hmyzu, ať už ve stádiu larvy či dospělé. Tyto bakterie jsou dobře uzpůsobeny k životu v alkalickém prostředí, což je přirozené prostředí uvnitř mesenteronu larev komárů, jehož hodnoty pH dosahují až pH 10,5, u dospělců se maximální hodnoty pH pohybují okolo 8,0-9,5 (Briones et al., 2008; Chavshin et al., 2014; Terenius et al., 2008; Wang et al., 2011).

5 Metody identifikace bakterií

Metody identifikace bakterií, vzniklé koncem 19. století, byly založené na fenotypových vlastnostech bakteriálních izolátů. Tyto vykultivované izoláty byly

klasifikovány na základě jejich morfologických znaků. K morfologickým znakům se ve 20. století ještě připojily charakteristiky fyziologické, biochemické či chemotaxonomické. Tyto techniky jsou však závislé na kultivaci daných bakterií a jak se později ukázalo, ne všechny bakteriální taxony lze takto kultivovat (Uhlík et al., 2013). Konkrétně z mořských bakterií je kultivovatelné 0,1 %, ze sladkovodních bakterií 0,1-3 % a z bakterií v sedimentu je kultivovatelné 0,25 % (Xu, 2006).

Od 60. let se k fenotypické metodě přidala identifikace bakterií na základě jejich genotypu, jež je založená na fylogenetické příbuznosti bakterií (Schleifer, 2009). Pro spolehlivou identifikaci mikroorganismů pomocí těchto genetických metod se nejčastěji využívá gen kódující 16S podjednotku ribozomální RNA. Tato molekula obsahuje jak konzervované, tak i variabilní oblasti a díky tomu je využívána jako fylogenetický marker. Jedinou nevýhodou sekvence genu 16S rRNA je, že v mnoha případech neumožňuje bakterie klasifikovat na úrovni druhu, což je důvod, proč je někdy termín bakteriální druh nahrazen termínem operační taxonomická jednotka (OTU). Tato jednotka je charakterizována jako shluk sekvencí 16S rRNA genů identických na určité prahové hodnotě (Uhlík et al., 2013).

Na detekci a identifikaci bakterií se tedy používají dvě základní metody, které se dělí podle toho, zda se bakterie z vybraných vzorků kultivují (kultivační metody) anebo zda dochází k izolaci DNA přímo ze vzorku (nekultivační metody). Dnes se velmi často setkáváme s kombinací obou těchto metod (Minard et al., 2013).

5.1 Kultivační metody identifikace

Kultivační metody identifikace jsou, i přes pár nevýhod, stále jedny z nejefektivnějších a nejsnazších mikrobiologických technik (Uhlík et al., 2013). Při kultivačních metodách identifikace je vzorek, například homogenát mesenteronu komárů a flebotomů, aplikován na živné médium. Existuje několik typů živných médií, jedny z nejpoužívanějších jsou LB agar a MacConkey agar. LB agar je tzv. neselektivní médium, které umožňuje růst velmi různorodým bakteriím, naopak MacConkey agar je médium selektivní, které slouží k izolaci zejména gram negativních bakterií (Rani et al., 2009; Vivero et al., 2016).

Po inkubaci na živném médiu naroste několik kolonií, které se mohou lišit morfologicky, například velikostí, tvarem či barvou. Takto morfologicky odlišné kolonie se znovu rozočkují na nové agarové plotny tak, aby vznikly čisté kultury (klony). Klony mohou být následně identifikovány fenotypicky (Apte-Deshpande et al.,

2012; Lindh et al., 2005; Maleki-Ravasan et al., 2013) nebo sekvenačně, a to nejčastěji na základě primární struktury genů pro 16S rRNA (Djadid et al., 2011; Yadav et al., 2015).

Sekvenační proces identifikace zahrnuje izolaci DNA ze vzniklých klonů, následnou amplifikaci cílových genů a jejich sekvenaci. Na amplifikaci genu pro 16S rRNA se například používají následující sekvence: 5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' nebo 5'-AGA GTT TGA TGG CTCAG-3' kódujícího primeru a 5'-GCT ACC TTG TTA CGA CTTC-3' nebo 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' antikódujícího (reverse) primeru (Djadid et al., 2011; Hillesland et al., 2008). Tento postup je však poněkud zdlouhavý.

Další metodou využívanou na identifikaci izolátů je hmotnostní spektrometrie (Sauer a Kliem, 2010). Při hmotnostní spektrometrii získáváme spektra látek obsažených v buňce, nejčastěji proteinových štěpů. Každé spektrum je charakteristické pro určitý taxon bakterií. Takto získaná spektra se následně porovnávají s údaji v databázi. Příkladem této metody je konkrétně tzv. celobuněčná MALDI-TOF technologie (Jurinke et al., 2004). Tato metoda je velmi rychlá a dokáže určit bakterie na úrovni druhů, ale její nevýhodou jsou velké pořizovací náklady na samotný přístroj a závislost na databázi referenčních spekter. To je důvod, proč je tato metoda dosud méně používaná nežli zmiňovaná sekvenace 16S rRNA (shrnutí dle Uhlík et al., 2013).

5.2 Nekultivační metody identifikace

Mezi nekultivační metody identifikace bakterií například patří identifikace 16S rRNA na základě fingerprintových technik, jakými jsou elektroforéza v teplotním či chemickém gradientu nebo studium polymorfismu délek terminálních fragmentů. Tyto metody se využívají k detekci změn bakteriální diversity v nějakém časovém období. Jednou z dalších metod je metagenomická analýza (Handelsman, 2004; Uhlík et al., 2013).

5.2.1 PCR-DGGE

Tato metoda identifikace se používá při zkoumání biodiverzity v rámci populace mikroorganismů. Principem této metody je rozdělení PCR produktů podle délky vzniklého řetězce. Tato metoda je schopná detekovat rozdíly mezi DNA fragmenty stejných délek, ale odlišných sekvencí. PCR produktem jsou nejčastěji amplifikované

fragmenty genů pro 16S rRNA. K rozdělení fragmentů stejných délek genů dochází pomocí denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) na základě jejich rozdílného denaturačního gradientu. (Muyzer et al., 1993; Ercolini, 2004).

Tato metoda byla v poslední době opakovaně využita i pro identifikaci střevních bakterií hmyzu. U flebotomů byla konkrétně použita u samiček *Lutzomyia longipalpis* a *Lutzomyia cruzi* z oblasti Brazílie a Kolumbie (Sant'Anna et al., 2012) nebo u *Phlebotomus perniciosus* (Fraihí et al., 2017). U komárů rodu *Aedes* ji využili Zouache et al. (2011).

5.2.2 PCR-TTGE

Elektroforéza v teplotním gradientu neboli *temporal temperature gradient gel electrophoresis* (TTGE) je modifikací TGGE, s tím rozdílem že teplota zde vzrůstá přímo úměrně s časem, což usnadňuje regulaci teploty. Princip metody je stejný jako u DGGE, pouze gradientem není denaturace, ale teplota (Vásquez et al., 2001). Metoda identifikace, která se nazývá PCR-TTGE a byla použita například u komárů rodu *Anopheles* (Minard et al., 2013; Ngo et al., 2015). TTGE byla využita při identifikaci bakterií u komárů rodu *Anopheles* z oblasti Vietnamu (Ngo et al., 2015).

5.2.3 T-RFLP

Terminal restriction fragment length polymorphism T-RFLP je fingerprintová metoda, která se používá pro studium mikrobiálního společenství založeného na genech pro 16S rRNA. Po izolaci DNA a naamplifikování 16S rRNA genů pomocí fluorescenčně značených kódujících a nekódujících primerů, dochází k použití restričních endonukleáz, které štěpí terminální konce PCR produktů a tím dojde k rozštěpení koncových a značených fragmentů. Každý označený fragment má odlišnou a přesně definovanou sekvenci nukleotidů. Tyto produkty jsou následně odděleny pomocí elektroforézy. Výsledkem jsou rozdílné velikosti fragmentů, které představují profil daného vzorku (Bruce a Hughes, 2000; Okhravi et al., 2000).

Tato metoda byla použita pro identifikaci bakterií ze zažívacího traktu u hmyzu, konkrétně u včel (Wu et al., 2013).

5.2.4 Metagenomická analýza

Relativně novou a u hmyzu a zatím málo používanou metodou na identifikaci mikrobiomu je tzv. metagenomická analýza (Handelsman, 2004). Metagenomika je soubor molekulárně biologických metod, které pracují s veškerou genetickou informací dostupnou ve vzorku. Umožňuje například enviromentální studie založené na analýze 16S rRNA genů amplifikovaných z DNA, která byla izolovaná přímo ze vzorku (Uhlík et al., 2013).

Genomické analýzy se obecně zaměřují na čisté vzorky či lehce izolovatelné mikroorganismy, které se při kultivaci ideálně rychle množí. Oproti tomu metagenomika se zabývá analýzou populací mikroorganismů, které však nemusí být předem kultivovány. Díky přímé izolaci genomu DNA z prostředí (například půda, voda), je možno vynechat kultivaci i následné klonování bakterií (Handelsman, 2004).

Postup při metagenomické analýze zahrnuje izolaci DNA ze vzorku, následné naklonování DNA do vhodného vektora, a transformace klonů do hostitelské bakterie. Během procesu transformace dochází ke vložení genetického materiálu klonu, do hostitelské bakterie. Tím vzniká transformant, tedy bakterie s takto vloženým exogenním genetickým materiálem, který nejčastěji představuje plasmid. Takto vzniklé klony se následně screenují. Vzniklé klony mohou být analyzované na základě fylogenetických markerů jako jsou ribosomální podjednotka- *16S rRNA* nebo protein zajišťující různé úpravy DNA- *recA*. (Courtois et al., 2003; Handelsman, 2004; Johnston et al., 2014; Tyson et al., 2004).

Jedním možným postupem metagenomické analýzy je analýza na základě sekvencí DNA- sekvenční analýza. Je to přístup založený na již získaných sekvencích a jejich následné analýze. Prvotním cílem je odhalit diverzitu mikroorganismů a jejich diverzitu genů. Nevýhodou však je, že zatím existuje nevelký počet DNA markerů, které nám poskytují spolehlivé fylogenetické zařazení. Pokud v našem vzorku/klonu není tento marker sekvenčně detekovatelný, není možné vzorek/klon identifikovat (Handelsman, 2004; Uhlík et al., 2013).

Využitelným, ale poměrně komplikovaným přístupem metagenomické analýzy je identifikace klonů na základě jejich heterologní exprese, tento přístup se nazývá funkční metagenomika. Úspěch tohoto přístupu vyžaduje přesnou transkripci a translaci, a v případě, že to test vyžaduje, tak i správnou sekreci genového produktu extracelulárně (Handelsman, 2004). Funkční metagenomická analýza již identifikovala

nová antibiotika nebo naopak geny způsobující rezistenci na antibiotika. Výhoda tohoto přístupu je v tom, že nevyžaduje aby geny, které nás zajímají byly rozpoznatelné sekvenační analýzou; to z něj dělá jedinou metodu metagenomiky, která má potenciál identifikovat celé nové třídy genů na základě jejich již známé či naopak doposud nové funkce (Handelsman, 2004).

Stejně jako sekvenační analýza, i funkční analýza má své omezení. Problémem je, že většina genů nebude exprimována v žádné konkrétní hostitelské bakterii. U této analýzy dochází k zásadnímu rozporu. Geny jsou klonovány z "exotických" organismů, s cílem objevit něco nového, ale zároveň je potřeba aby byly tyto geny exprimovány v běžných bakteriích jako je například *E. coli* (Handelsman, 2004).

První použití metagenomické analýzy pro výzkum mikroorganismů asociovaných ve střevě flebotomů bylo popsáno u *Lutzomyia longipalpis* (McCarthy et al., 2011).

6 Vliv mikrobioty na vývoj protist ve střevech komárů a flebotomů

Hmyz je vystaven široké škále mikroorganismů, kterou získává z prostředí, ve kterém žije. Některé bakterie si vytvořily symbiotický vztah, jiné jsou komenzálové, kteří se adaptovali tak, aby mohly přetrvat uvnitř těla hmyzu. Symbiotické bakterie osidlují různé orgány hmyzu konkrétně střevo, ovaria, Malpighické trubice či hemocoel. Některé studie ukázaly, že bakterie mohou hmyzímu hostiteli poskytovat nutriční výhodu, podobně jako je tomu ve střevech termitů (Brune, 1998; Dennison et al., 2014).

Nemoci přenášené vektorem vyžadují ke svému přenosu interakci mezi hostitelem, patogenem a hmyzím vektorem, což zahrnuje interakci s mikrobiotou přenašeče (Schlein et al., 1985).

Prvním místem kontaktu, kde se parazit setkává s epitelem komárů či flebotomů, je mesenteron. Zde má parazit první příležitost se přichytit nebo proniknout do okolní tkáně tak, aby dokončil svůj vývoj a byl schopen nakazit člověka či jiného obratlovce (Azambuja et al., 2005; Dennison et al., 2014).

Bakterie přítomné v zažívacím traktu hmyzu mají schopnost regulovat imunitní odpověď hmyzu, což následně ovlivňuje přenašečovu kompetenci k přenosu patogenů. Kromě vlivu na přenašečovu kompetenci skrze imunitní systém, mohou bakterie snižovat vývoj parazitů tím, že ve střevě může docházet k bakteriální produkci sekundárních metabolitů, jako jsou například *reactive oxygen species* (ROS) (Dennison

et al., 2014; Diaz-Albiter et al., 2012; Dong et al., 2009; Kumar et al., 2003; Molina-Cruz et al., 2008).

Část vývojové cyklu leishmanií a plasmodií, který probíhá v mesenteronu přenašečů, představuje kritický bod, kdy dochází k silné redukci počtu konkrétních stádií parazita. Pro plasmodium je kritická doba, kdy dochází k invazi ookinetu do epitelu mesenteronu, tedy doba před tím, než dojde k encystaci oocysty na basální lamině. Navzdory tomu, že se do těla komára dostanou spolu s nasátou krví desítky tisíc gametocytů, tak počty vzniklých oocyst jsou v počtech jednotek, maximálně desítek (Sinden a Billingsley, 2001). Leishmanie se vyvíjejí, v porovnání s plasmodiem, v mesenteronu poměrně dlouhou dobu, neboť zde prodělávají celý životní cyklus, který trvá i více jak týden. Vysoká úmrtnost parazitárních protist v této části vývoje je výsledkem souhry několika faktorů, kterými jsou trávicí enzymy hmyzu, jeho imunitní odpověď hmyzu a přirozeně získaná střevní bakteriální flóra (Azambuja et al., 2005; Dong et al., 2009; Dennison et al., 2014; Dillon a Dillon, 2004).

Vliv mikrobioty na protista ve střevech komárů i flebotomů byl již dlouho známý, velkou neznámou však představují mechanismy tohoto vzájemného působení (Schlein et al., 1985; Pumpuni et al., 1993, 1996). Se vzrůstajícím zájmem o využití vlivu symbiotických bakterií hmyzu v boji proti lidským patogenům, se poznatky o mikrobiotě komárů neustále rozšiřují. Avšak o mikrobiotě flebotomů a jejím vlivu na vývoj leishmanií je poznatků minimum. To je důvod, proč tato práce nemohla být zaměřena pouze na flebotomy a většina interakcí mezi bakteriemi a protisty je vysvětlena na příkladu komárů a plasmodií.

6.1 Imunitní odpověď hmyzu proti patogenům

Většina informací o imunitním systému hmyzu vychází z imunitních odpovědí modelových organismů, kterými jsou *Drosophila sp.* a komáři rodu *Anopheles* (Clayton et al., 2014; Dennison et al., 2014; Karlikow et al., 2014). Hmyzí imunitní systém je kontrolován skrze různé imunitní signální kaskády. Jedním z prvních kroků antipatogenní imunitní odpovědi je rozeznání patogenů na základě receptorů *PRRs* (Pattern Recognition Receptors). Poté následuje spouštění signálních imunitních drah, jejichž výsledkem může být fagocytóza, melanizace, enkapsulace či produkce antimikrobiálních peptidů (AMPs) a dalších anti-mikrobiálních molekul (Dimopoulos, 2003; Lavine a Strand, 2002).

Peptidoglykan buněčné stěny bakterií aktivuje signalizační dráhy imunity a zároveň může indukovat expresi genů pro AMPs, které budou reagovat jak proti bakteriím, tak proti plasmodiu zároveň (Dong et al., 2009, 2006). Například, transmembránový protein PGRPLC u *Anopheles gambiae* rozeznávající PGN gram negativních i gram pozitivních bakterií spouští expresi AMPs, konkrétně *CEC1* a *DEF1* (Bahia et al., 2014; Meister et al., 2009).

Signalizační dráha Toll zahrnuje transmembránový Toll receptor, kinázy a transkripční faktor NF- κ B, který se u komára rodu *Anopheles* nazývá Relish 1 (REL 1). Tento transkripční faktor se váže v jádře na promotor AMPs (či jiných cílových genů) a následně dojde k ovlivnění jejich transkripce (Lemaitre a Hoffmann, 2007). Díky rozdílné stavbě peptidoglykanu je Toll dráha aktivována především gram pozitivními bakteriemi, houbami a viry (Gobert et al., 2003; Kim a Kim, 2005). PGRP po detekci bakterií aktivují proteolytickou kaskádu, dojde k aktivaci extracelulárního cytokinu, který se následně váže na Toll receptor, což ve výsledku vede ke spuštění transkripčního faktoru NF- κ B (Lemaitre a Hoffmann, 2007).

Signalizační dráha Imd je spuštěna většinou gram negativními bakteriemi, ale i některými gram pozitivními bakteriemi, které jsou rozpoznány komplexem PGRPs. *Anopheles gambiae* kóduje sedm PGRPs (ortology u *Drosophila sp.* LA, LB, LC, LD, a tři neortologní izoformy PGRP-LC: LC1, LC2 a LC3) (Meister et al., 2009). PGRP-LC je nezbytný při obraně proti bakteriím. Transkripčním faktorem v této dráze je u *Anopheles* Relish 2 (REL 2). Imd spolu s NF- κ B REL2 hraje důležitou roli v imunitní odpovědi jak proti bakteriím, tak proti virům ale i lidským plasmodiím (konkrétně *Plasmodium falciparum*) (Garver et al., 2012). Po utlumení exprese genů PGRPs u *Anopheles gambiae*, byl tento komár infikován bakteriemi a zároveň plasmodiem a

výsledkem byl velký nárůst plasmodiální infekce. Autoři zkoumali tento efekt po 24 hodinách po nasátí samic krve (perioda, která se shoduje s proliferací střevních bakterií a sexuálním vývojem gametocytů) a došli k závěru, že PGRPLC snižuje proliferaci bakterií i intenzitu parazitární infekce (Meister et al., 2009)

Pro plnohodnotnou expresi AMPs u *Drosophila sp.* (konkrétně cekropin, attacin a defensin) je nutná spolupráce jak Imd dráhy tak Toll signální dráhy (Levashina et al., 1995).

Třetí signální dráhou u hmyzu je JAK/STAT, která funguje jako zprostředkovatel obrany proti bakteriím, houbám a proti plasmodiu. Tato signální dráha stojí, mimo jiné, i za proliferací hemocytů (Bahia et al., 2011). Dochází zde k aktivaci Janus kinázy Hopschotch (JAK Hop) pomocí ligandu vázaného na transmembránový protein. JAK Hop fosforyluje transkripční faktor STAT, který se následně přemísť do jádra buňky, kde posléze aktivuje transkripci cílových genů (Agaisse et al., 2003).

Mezi antibakteriální, antiparazitární a antivirální imunitní odpovědi dochází k vzájemnému a rozsáhlému překrývání signálních drah. Například antiplasmodiální aktivita určitých genů může být modulována jejich paralelní aktivitou proti bakteriím. tudíž mikrobiota představuje klíčový faktor pro náchylnost vektora pro parazity a má vliv na vývoj protist ve střevech komárů a flebotomů (Dong et al., 2006, 2009; Ramirez et al., 2012).

6.2 Vliv mikrobioty na kompetenci komárů vůči plasmodiím

Většina bakterií ve střevech hmyzu je gram negativních, z čehož různí autoři vyvozují, že právě tyto gram negativní bakterie stojí za inhibičním efektem vývoje jak leishmanií tak plasmodií (Djadid et al., 2011; Hillesland et al., 2008; Pumpuni et al., 1996, 1993; Schlein et al., 1985). Poznatky o vlivu konkrétních bakterií na vývoj plasmodií v komárech rodu *Anopheles* je uveden v Tabulka 1 .

Bakterie	Dopad na kompetenci komářího přenašeče
EspZ	Produkce <i>reactive oxygen species</i> (ROS), což má za následek vyšší rezistenci komára <i>An. gambiae</i> vůči plasmodiím
<i>Serratia marcescens</i>	Blokuje sporogonický vývoj <i>Plasmodium vivax</i> ve střevech <i>Anopheles albimanus</i> . Mezi druhová diverzita určuje úroveň inhibice <i>Plasmodium berghei</i> u <i>A. stephensi</i> . Redukuje citlivost komára <i>A. stephensi</i> vůči <i>P. falciparum</i>
<i>Enterobacteriaceae</i> sp	V <i>A. gambiae</i> , který je nakažen <i>P. falciparum</i> , je větší abundance <i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	Zvyšuje expresi <i>SRPN6</i> u <i>A. stephensi</i> , což vede ke zvýšení imunitní odpovědi proti <i>P. falciparum</i> . Inhibuje vývoj <i>P. vivax</i> v přenašeči <i>A. albimanus</i> .
<i>Enterobacter amnigenus</i>	Inhibuje vývoj <i>P. vivax</i> v přenašeči <i>A. albimanus</i> .
<i>Acinetobacter</i> sp	Zvyšuje rezistenci <i>A. gambiae</i> vůči vývoji plasmodia, skrze indukci signální kaskády
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Gram negativní bakterie redukuje počty <i>P. falciparum</i> u <i>A. stephensi</i> .
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram negativní bakterie redukuje počty <i>P. falciparum</i> u <i>A. stephensi</i> .
<i>Escherichia coli</i>	Gram negativní bakterie redukuje počty <i>P. falciparum</i> u <i>A. stephensi</i> .
<i>Cedecea lapagei</i>	Gram negativní bakterie redukuje počty <i>P. falciparum</i> u <i>A. stephensi</i> .
<i>Ewingella americana</i>	Gram negativní bakterie redukuje počty <i>P. falciparum</i> u <i>A. stephensi</i> .
<i>Wolbachia</i> – wals	Snižuje citlivost <i>Anopheles stephensi</i> vůči plasmodiu, potenciálně skrze produkci ROS
<i>Wolbachia</i> – wMelPop	Snižuje počty <i>P. berghei</i> v <i>A. gambiae</i> .

Tabulka 1 Vliv bakterií na vývoj plasmodií v komárech rodu *Anopheles* (podle Dennison a kol., 2014, upraveno).

U *Anopheles stephensi*, který byl koinfikován gram negativními bakteriemi (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Ewingella americana*) a plasmodiemi, došlo buď k částečné nebo úplné inhibici sporogonického vývoje *Plasmodium falciparum*. Gram pozitivní bakterie, naopak sporogonický vývoj neinhibovaly (Pumpuni et al., 1993).

Podobné potlačení sporogonického vývoje bylo pozorováno u třech zástupců komárů rodu *Anopheles*, konkrétně *An. stephensi*, *An. gambiae*, a *An. albimanus*. Při zvyšování bakteriálních počtů, docházelo k postupné redukci oocyst *Plasmodium falciparum* ve střevech těchto komárů (Pumpuni et al., 1996). K potlačení sporogonického vývoje bakteriemi došlo i u *Anopheles albimanus* nakaženého *Plasmodium vivax* (Gonzalez-Ceron et al., 2003).

Komáři *Anopheles gambiae*, kterým byla podávána antibiotika (aseptičtí komáři), byly signifikantně citlivější k nákaze *Plasmodium falciparum*, než jedinci, kterým antibiotika podávána nebyla (septičtí komáři). Nákaza se porovnávala počtem oocyst

v mesenteronu střeva. Zvýšený počet oocyst u aseptických jedinců je výsledkem absence nebo sníženého počtu střevních bakterií. Přítomnost mikrobiální flóry ovlivňuje mortalitu komárů během vývoje plasmodií. Přibližně 60% septických komárů, zahynulo již sedmý den infekce. Naproti tomu u aseptických komárů, jejichž počet oocyst byl až 5krát vyšší, zahynulo za stejnou dobu pouze 40%. Autoři předpokládají, že vyšší mortalita septických komárů je dána souběžným výskytem bakterií a plasmodií v mesenteronu přenašeče (Dong et al., 2009).

U *Anopheles gambiae* byl studován vliv bakterií, které byly inaktivovány teplem. Pomocí porovnávání vlivu s živými bakteriemi došli autoři k závěru, že inhibiční efekt na uchycení parazitární infekce uvnitř střeva hmyzu mají pouze živé bakterie. Silnější inhibiční efekt živých bakterií může být ale jednoduše způsoben tím, že se množí a výsledkem znásobení jejich počtu je vyvolání mnohem silnější imunitní odpovědi, než je tomu u mrtvých bakterií (Dong et al., 2009)

Pro pochopení negativního vlivu bakterií na vývoj plasmodií u *Anopheles gambiae* byla provedena celogenomová analýza. Porovnání septických a aseptických jedinců odhalilo rozdílnou expresi 185 genů. Podobný počet genů (195) byl regulován přítomností endogenní bakteriální flóry po nasátí neinfekční krve. (Dong et al., 2009).

Tyto regulované geny jsou většinou geny zajišťující odpověď přirozené imunity. Septičtí komáři exprimovali geny kódující cekropin, defecin nebo gambicin. Překvapivě v septických komárech byla snížena exprese antiplasmodiálního faktoru FBNs6, FBNs9 a FBNs36. Exprese lysozymu c-1, která je spojovaná s melanizací, byla zvýšená v septických a cukrem nakrmených komárech, neboť i lysozym je klíčovým antibakteriálním faktorem (Dong et al., 2006).

Stimulace imunitní aktivity se následně projevuje jako citlivost nebo náchylnost komára k odlišným patogenům, což se odráží ve vektorové kapacitě. Antiplasmodiální imunitní odpověď je stimulována spíše přítomností bakterií než samotným plasmodiem. Imunitní systém zároveň kontroluje i bakteriální proliferaci, tudíž je mezi zvyšujícím se počtem bakterií a zvyšující se produkcí antiplasmodiálního efektu u komárů *Anopheles gambiae*, pozitivní korelace (Dong et al., 2009).

Vliv mikrobioty může mít i přímý dopad na vývoj protist uvnitř střeva přenašeče. Identifikovaná bakterie u komárů rodu *Anopheles* z kmene *Enterobacteriaceae- Esp_Z* je schopná přímo ovlivňovat plasmodium na základě mechanismů, které zahrnují bakteriální produkci ROS (Cirimotich et al., 2011). Na základě *in vitro* pokusů byl odhalen přímý inhibiční efekt bakterie *Serratia marcescens* na *Plasmodium berghei* u *Anopheles gambiae*. Autoři navrhuji, že tato antiplasmodiální aktivita byla

zprostředkována *Serratia marcescens* pomocí sekrečního rozpustného faktoru, který zasahuje do vývoje plasmodia, předtím než se z plasmodia stává pohyblivý ookinet (Bahia et al., 2014).

6.3 Vliv mikrobioty na kompetenci flebotomů vůči leishmaniím

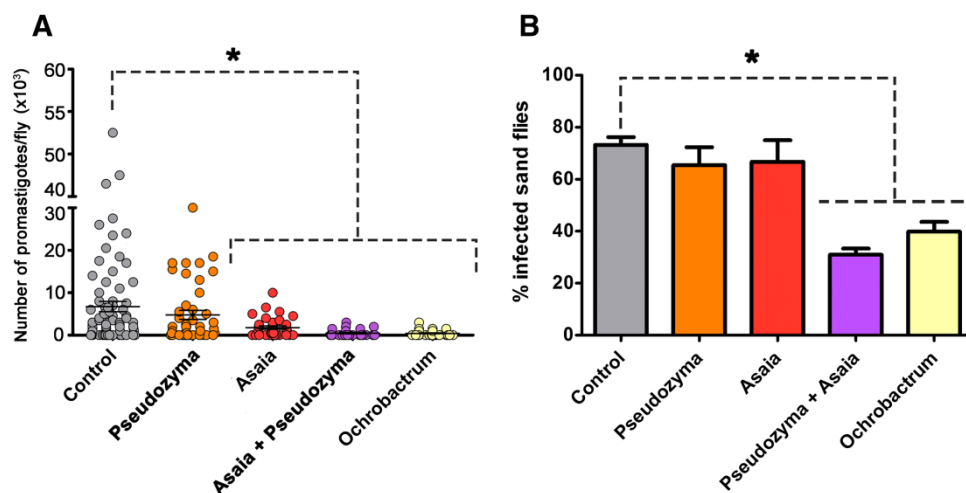
První zmínka o možném vlivu bakterií na leishmanie ve střevech flebotomů *Phlebotomus papatasi* byla publikována již před devadesáti lety (Adler a Theodor, 1927, cit. dle ; Schlein et al., 1985). Následně byl vliv bakterií na vývoj protist potvrzen u *P. papatasi*, který byl přirozeně infikován bakteriemi nebo houbami a následně pak leishmaniemi. V tomto případě došlo v mesenteronu k potlačení vývoje promastigotů *Leishmania major*. (Schlein et al., 1985).

U *Phlebotomus papatasi* se ještě Schlein et al. (1985) zabývali obsahem divertikula a jeho baktericidní aktivitou proti konkrétním bakteriím. Divertikulum a jeho obsah injikovali na jednotlivé Petriho misky, kde byly čisté kultury konkrétních bakterií. Divertikulum a jeho obsah měli inhibiční efekt na růst těchto bakterií: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Streptococcus sp.* a *Pseudomonas aeruginosa*. Tento inhibiční efekt však trval pár hodin a byl zpozorován jen do určité vzdálenosti bakterií od obsahu divertikula na Petriho misce. Na základě pozorování autoři spekulovali o vlivu bakteriálních inhibitorů, přítomných v divertikulu, na obsah střeva *Phlebotomus papatasi*. Výsledkem spekulace bylo, že obsah divertikula má pravděpodobně vliv na bakterie přítomné ve střevě, ale divertikulum není jediným zdrojem bakteriálních inhibitorů. (Schlein et al., 1985)

Stejně jako u komárů, tak i u flebotomů může docházet k přímému ovlivnění vývoje protist bakteriemi. Vliv *Serratia marcescens* byl zkoumán u *Leishmania chagasi* *in vitro* (Moraes et al., 2008). Pokusy byly provedeny se dvěma typy entomopatogenních bakterií *Serratia marcescens*, které interagovaly s *Leishmania chagasi*. Prvním typem je *Serratia marcescens* SM365, která produkuje pigment, tzv. *prodigiosin*, a způsobuje lyzi buněk *L. chagasi*, a druhým typem je *Serratia marcescens* DB11, která naopak *prodigiosin* neprodukuje a leishmanie nelyzuje. Tato bakterie disponuje fimbriemi s lektinovou aktivitou specifickou pro manózu, pomocí kterých se váže jak k biologickým tak k nebiologickým povrchům. Pomocí fimbrií bakterie také lyzuje buňky *Leishmania chagasi*. Bakterie adhezuje na parazita v oblasti jeho periflagelární kapsy, kde vytváří filamenta, pomocí kterých propojuje okolní bakterie spolu s parazitem a společně vytváří okolo lyzované buňky tzv. biofilm. Bakterie

SM365 silně redukuje počet promastigotů *Leishmanie chagasi* v kultuře a intenzita této redukce je závislá na koncentraci dané bakterie. Při koncentraci bakterií 1×10^8 CFU/ml) je téměř celá populace leishmanií zlyzována během 120 minut (Moraes et al., 2008).

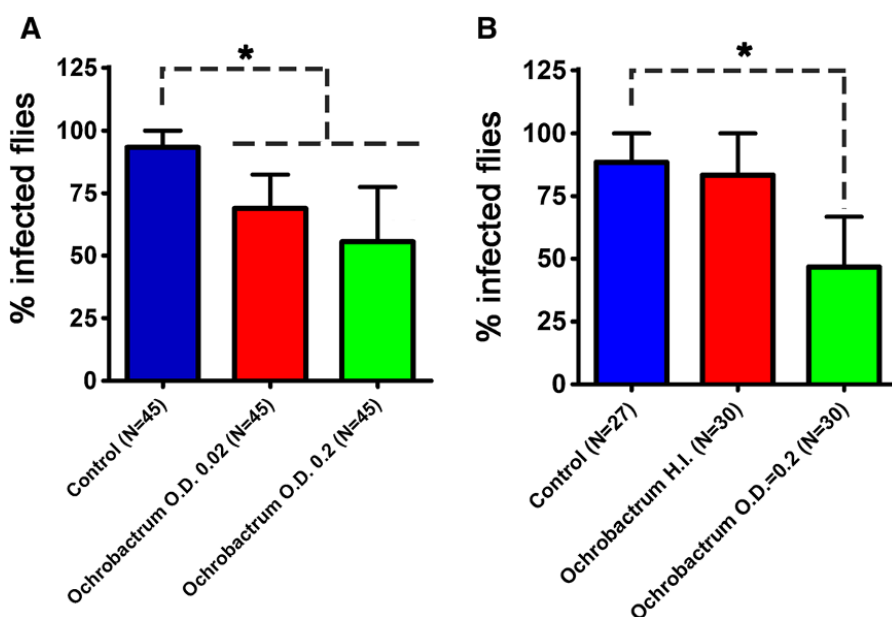
Obecně ve střevě obratlovců platí, že přítomnost přirozené střevní mikroflóry chrání jedince, před potenciálními patogeny (Lawley a Walker, 2013). Tato schopnost střevní mikroflóry chránit hostitele, byla použita v podobném konceptu i u křídlatého hmyzu (řád *Lepidoptera* nebo *Diptera*) (Dillon a Dillon, 2004). Na základě tohoto konceptu byly provedeny pokusy s *Lutzomyia longipalpis*, kdy flebotomové infikování v různém pořadí bakteriemi a houbami, *Asaia sp.* a *Ochrobactrum intermedium*, houba *Pseudozyma*) a leishmaniemi (*Leishmania mexicana*) (Sant'Anna et al., 2014). V prvním případě bylo střevo hmyzího přenašeče nejprve infikováno bakteriemi a houbami, 4 dny před nasátím. Během následného sání krve došlo k nakažení flebotomů leishmaniemi. Vliv na populaci *Leishmania mexicana* byl pozorován dle porovnávání počtů promastigotů. V tomto prvním experimentu bylo zkoumáno, zdali střevní bakterie mohou chránit střevo hostitele před vývojem leishmanií. Výsledky prvního experimentu jsou zobrazeny v Obr. č. 1.



Obrázek. 1 Dopad primárního nakažení bakteriemi a houbami na velikost populace leishmanií (A) Populace promastigotů *L.mexicana* po pozření *Pseudozyma sp.*, *Asaia sp.* nebo *O. intermedium*. Kolečka znázorňují individuální počet parazitů ve střevě individuálního jedince flebotomů (B) Procentuální zastoupení samic infikovaných leishmaniemi. Kontrolní skupiny krmeny cukrem (podle Sant'Anna et al., 2014 upraveno).

Primární nakažení houbami a bakteriemi výrazně redukuje velikost populace leishmanií. K ještě větší redukci počtů promastigotů dochází v případě, jsou li v kultuře mikroorganismů jak zástupci bakterií, tak hub (Sant'Anna et al., 2014).

Efekt bakterií na redukci promastigotů byl pozorován i s různými koncentracemi bakterie *Ochrobactrum intermedium* a zároveň byl porovnáván efekt bakterií, které jsou inaktivované teplem. Bylo zjištěno, že rezistence vůči parazitární infekci není závislá na koncentraci přítomných bakterií, neboť mezi jednotlivými koncentracemi bakterií nebyl zpozorován silnější/slabší efekt. A aby měly bakterie nějaký vliv na vývoj leishmanií ve střevech flebotomů, musí být živé. Efekt teplotně inaktivovaných bakterií se příliš neliší od kontrolních jedinců (Sant'Anna et al., 2014).



Obrázek 2 Efekt koncentrace bakterií a teplotně inaktivovaných bakterií *O. intermedium* na procentuální zastoupení samic *Lu. longipalpis* infikovaných *L. mexicana* (A) Rozdílná koncentrace *O. intermedium* 10^6 (O. D. 0.02) CFU/mL a 10^7 (O. D. 0.2) CFU/mL, kontrolní samice krmeny pouze cukrem. (B) Efekt teplotně inaktivovaných bakterií (HI) 10^7 CFU/mL (podle Sant'Anna et al., 2014 upraveno).

V druhé části experimentu, byl pozorován vliv leishmanií na infekci entomopatogenními bakteriemi, které jsou pro hmyz často smrtelné. Flebotomové byli nejdříve infikováni leishmaniemi a následně bakteriemi. Entomopatogenní bakterie, která byla použita, je již zmiňovaná *Serratia marcescens*. Flebotomové, kteří sáli krev bez leishmanií a následně jim byla denně podávána tato bakterie, podlehli v naprosté většině bakteriální infekci a pouze 11% přežilo prvních 6 dní od bakteriální infekce. Naproti tomu u flebotomů, kteří byli nejprve nakaženi z krve amastigoty a poté

vystavení *Serratia marcescens*, kde bylo procento přeživších mnohem větší -56%.
Přítomnost *Leishmania mexicana* tedy zvýšila odolnost flebotomů *L. longipalpis* vůči infekci entomopatogenních bakterií *Serratia marcescens* (Sant'Anna et al., 2014).

7 Závěr

Bakterie osidlující mesenteron střeva komárů a flebotomů mohou hrát důležitou roli v kapacitě a kompetenci těchto vektorů. V mé práci shrnuji zdroje bakteriální infekce komárů a flebotomů, složení jejich střevní mikrobioty na základě různých metod identifikace a v neposlední řadě se zabývám mechanismy vlivu bakterií na vývoj protist v těchto přenašečích, které jsou většinou vysvětleny na komárech.

Zdroje bakteriální infekce hematofágního dvoukřídlého hmyzu mohou být různorodé v závislosti na vývojovém stádiu hmyzu a potravě, kterou se živí. Kromě pohlcení mikroorganismů spolu s potravou, se bakterie mohou přenášet různými typy přenosů z jedince na jedince. Příkladem těchto typů přenosů je přenos transstadiální, transovariální nebo přenos horizontální.

Bakteriální diverzita ve střevech komárů a flebotomů je ovlivňována různými faktory. Jedním z faktorů je efekt lokality, bakteriální diverzita je závislá jak na geografickém původu přenašeče, tak na momentálním místě jeho vyskytu. Dalším z nezanedbatelných faktorů ovlivňující bakteriální diverzitu ve střevě hematofágního dvoukřídlého hmyzu je sání krve dospělých samiček. Po sání sice počty bakterií nápadně vzrůstají, ale u druhového složení bakteriálního mikrobiomu je tomu naopak: druhová diverzita bakterií několik hodin po sání klesá. U všech vývojových stádií komárů a flebotomů tvoří majoritní část bakteriálního složení gram negativní bakterie. Počty gram pozitivních bakterií, mezi vývojovými stádii kolísají, avšak nejvyšší jsou během larválního vývoje či u nově vzniklých dospělců, jelikož gram pozitivní bakterie jsou u flebotomů nejčastěji získávány z půdních líhnišť a u komárů z vodního prostředí.

Na identifikaci bakterií a složení bakteriální diverzity jsou používány dva základní typy identifikačních metod. Starší metody vyžadují kultivace bakterií, kdy vyizolované kultury jsou následně identifikovány na základě svého fenotypu. Modernějším typem identifikace bakterií jsou metody nekultivační, při kterých dochází k přímé izolaci DNA, aniž by bakterie předtím musely růst živném médiu. Soubor molekulárních metod založených na přímé izolaci DNA z celého vzorku se nazývá metagenomika.

Různé bakterie identifikované na základě těchto metod mají různý vliv na vývoj protist ve střevě přenašeče. Bakterie svou přítomností spouští různé signalizační dráhy imunitního systému, které kontrolují nejen bakteriální proliferaci, ale zároveň mohou ovlivňovat vývoj protist a náchylnost vektora k jejich usídlení. Zároveň však může docházet i k tomu, že parazitární protista, konkrétně leishmanie, chrání přenašeče před některými entomopatogenními bakteriemi.

Vliv bakteriální symbiotické mikrobioty na vývoj protist ve střevech komárů a flebotomů může být použit v boji proti těmto parazitárním onemocněním. Je to téma, kterému bych se ráda věnovala i ve své diplomové práci.

8 Použitá literatura

- Adler, S., Theodor, O., 1927.** The Behaviour of Cultures of *Leishmania sp.* in *Phlebotomus Papatasii*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 21, 111–134.
- Agaisse, H., Petersen, U.M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B., Perrimon, N., 2003.** Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Developmental Cell* 5, 441–450.
- Akhoundi, M., Bakhtiari, R., Guillard, T., Baghaei, A., Tolouei, R., Sereno, D., Toubas, D., Depaquit, J., Abyaneh, M.R., 2012.** Diversity of the Bacterial and Fungal Microflora from the Midgut and Cuticle of *Phlebotomine* Sand Flies Collected in North-Western Iran. *PLOS ONE* 7, e50259.
- Apte-Deshpande, A., Paingankar, M., Gokhale, M.D., Deobagkar, D.N., 2012.** *Serratia odorifera* a Midgut Inhabitant of *Aedes aegypti* Mosquito Enhances Its Susceptibility to Dengue-2 Virus. *PLOS ONE* 7, e40401.
- Azambuja, P., Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A., 2005.** Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in Parasitology*. 21, 568–572.
- Bahia, A.C., Dong, Y., Blumberg, B.J., Mlambo, G., Tripathi, A., BenMarzouk-Hidalgo, O.J., Chandra, R., Dimopoulos, G., 2014.** Exploring *Anopheles* gut bacteria for *Plasmodium* blocking activity. *Environmental Microbiology* 16, 2980–2994.
- Bahia, A.C., Kubota, M.S., Tempone, A.J., Araújo, H.R.C., Guedes, B.A.M., Orfanó, A.S., Tadei, W.P., Ríos-Velásquez, C.M., Han, Y.S., Secundino, N.F.C., Barillas-Mury, C., Pimenta, P.F.P., Traub-Csekö, Y.M., 2011.** The JAK-STAT Pathway Controls *Plasmodium vivax* Load in Early Stages of *Anopheles aquasalis* Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5, e1317.
- Bates, P.A., 2007.** Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by *phlebotomine* sand flies. *International Journal for Parasitology* 37, 1097–1106.

- Boissière, A., Tchioffo, M.T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S.E., Shahbazkia, H.R., Awono-Ambene, P.H., Levashina, E.A., Christen, R., Morlais, I., 2012.** Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum* Infection. *PLOS Pathogens* 8, e1002742.
- Briones, A.M., Shililu, J., Githure, J., Novak, R., Raskin, L., 2008.** *Thorsellia anophelis* is the dominant bacterium in a Kenyan population of adult *Anopheles gambiae* mosquitoes. *ISME Journal* 2, 74–82.
- Bruce, K.D., Hughes, M.R., 2000.** Terminal restriction fragment length polymorphism monitoring of genes amplified directly from bacterial communities in soils and sediments. *Molecular Biotechnology* 16, 261–269.
- Brune, A., 1998.** Termite guts: the world's smallest bioreactors. *Trends in Biotechnology* 16, 16–21.
- Burkett, D.A., Carlson, D.A., Kline, D.L., 1998.** Analysis of composition of sugar meals of wild mosquitoes by gas chromatography. *Journal of the American Mosquito Control Association* 14, 373–379.
- Chavshin, A.R., Oshaghi, M.A., Vatandoost, H., Pourmand, M.R., Raeisi, A., Terenius, O., 2014.** Isolation and identification of culturable bacteria from wild *Anopheles culicifacies*, a first step in a paratransgenesis approach. *Parasites and vectors* 7, 419.
- Cirimotich, C.M., Dong, Y., Clayton, A.M., Sandiford, S.L., Souza-Neto, J.A., Mulenga, M., Dimopoulos, G., 2011.** Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science* 332, 855–858.
- Clayton, A.M., Dong, Y., Dimopoulos, G., 2014.** The *Anopheles* innate immune system in the defense against malaria infection. *Journal of Innate Immunity* 6, 169–181.

- Coon, K.L., Brown, M.R., Strand, M.R., 2016.** Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Molecular Ecology* 25, 5806–5826.
- Coon, K.L., Vogel, K.J., Brown, M.R., Strand, M.R., 2014.** Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Molecular Ecology* 23, 2727–2739.
- Courtois, S., Cappellano, C.M., Ball, M., Francou, F.-X., Normand, P., Helynck, G., Martinez, A., Kolvek, S.J., Hopke, J., Osburne, M.S., August, P.R., Nalin, R., Guérineau, M., Jeannin, P., Simonet, P., Pernodet, J.-L., 2003.** Recombinant Environmental Libraries Provide Access to Microbial Diversity for Drug Discovery from Natural Products. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 49–55.
- Damiani, C., Ricci, I., Crotti, E., Rossi, P., Rizzi, A., Scuppa, P., Capone, A., Ulissi, U., Epis, S., Genchi, M., Sagnon, N., Faye, I., Kang, A., Chouaia, B., Whitehorn, C., Moussa, G.W., Mandrioli, M., Esposito, F., Sacchi, L., Bandi, C., Daffonchio, D., Favia, G., 2010.** Mosquito-Bacteria Symbiosis: The Case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microbial Ecology* 60, 644–654.
- Dennison, N.J., Jupatanakul, N., Dimopoulos, G., 2014.** The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Current Opinion in Insect Science, Vectors and medical and veterinary entomology* 3, 6–13.
- Diaz-Albiter, H., Sant’Anna, M.R.V., Genta, F.A., Dillon, R.J., 2012.** Reactive Oxygen Species-mediated Immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the Phlebotomine Sand Fly *Lutzomyia longipalpis*. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 23995–24003.
- Dillon, R.J., Dillon, V.M., 2004.** The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology* 49, 71–92.
- Dillon, R.J., Kordy, E.E., Shehata, M., Lane, R.P., 1996.** The prevalence of a microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 90, 669–673.

- Dimopoulos, G., 2003.** Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cellular Microbiology* 5, 3–14.
- Djadid, N.D., Jazayeri, H., Raz, A., Favia, G., Ricci, I., Zakeri, S., 2011.** Identification of the Midgut Microbiota of *An. stephensi* and *An. maculipennis* for Their Application as a Paratransgenic Tool against Malaria. *PLOS ONE* 6, e28484.
- Dong, Y., Aguilar, R., Xi, Z., Warr, E., Mongin, E., Dimopoulos, G., 2006.** *Anopheles gambiae* Immune Responses to Human and Rodent *Plasmodium* Parasite Species. *PLOS Pathogens* 2
- Dong, Y., Manfredini, F., Dimopoulos, G., 2009.** Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites. *PLOS Pathogens* 5, e1000423.
- Dougherty, M.J., Guerin, P.M., Ward, R.D., 1995.** Identification of oviposition attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in volatiles of faeces from vertebrates. *Physiological Entomology* 20, 23–32.
- Duguma, D., Hall, M.W., Rugman-Jones, P., Stouthamer, R., Terenius, O., Neufeld, J.D., Walton, W.E., 2015.** Developmental succession of the microbiome of *Culex* mosquitoes. *BMC Microbiology* 15, 140–152.
- Ercolini, D., 2004.** PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56, 297–314.
- Fraihi, W., Fares, W., Perrin, P., Dorkeld, F., Sereno, D., Barhoumi, W., Sbissi, I., Cherni, S., Chelbi, I., Durvasula, R., Ramalho-Ortigao, M., Gtari, M., Zhioua, E., 2017.** An integrated overview of the midgut bacterial flora composition of *Phlebotomus perniciosus*, a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in the Western Mediterranean Basin. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11, e0005484.

- Garver, L.S., Bahia, A.C., Das, S., Souza-Neto, J.A., Shiao, J., Dong, Y., Dimopoulos, G., 2012.** *Anopheles* Imd Pathway Factors and Effectors in Infection Intensity-Dependent Anti-Plasmodium Action. *PLOS Pathogens* 8, e1002737.
- Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A.A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J.A., Ferrandon, D., 2003.** Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science* 302, 2126–2130.
- Gonzalez-Ceron, L., Santillan, F., Rodriguez, M.H., Mendez, D., Hernandez-Avila, J.E., 2003.** Bacteria in Midguts of Field-Collected *Anopheles albimanus* Block *Plasmodium vivax* Sporogonic Development. *Journal of Medical Entomology* 40, 371–374.
- Handelsman, J., 2004.** Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 669–685.
- Hillesland, H., Read, A., Subhadra, B., Hurwitz, I., McKelvey, R., Ghosh, K., Das, P., Durvasula, R., 2008.** Identification of Aerobic Gut Bacteria from the *Kala Azar* Vector, *Phlebotomus argentipes*: A Platform for Potential Paratransgenic Manipulation of Sand Flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79, 881–886.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., Claverys, J.-P., 2014.** Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology* 12, 181–196.
- Josling, G.A., Llinás, M., 2015.** Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. *Nature Reviews Microbiology* 13, 573–587.
- Jurinke, C., Oeth, P., van den Boom, D., 2004.** MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis. *Molecular Biotechnology* 26, 147–164.

- Kageyama, D., Narita, S., Watanabe, M., 2012.** Insect Sex Determination Manipulated by Their Endosymbionts: Incidences, Mechanisms and Implications. *Insects* 3, 161–199.
- Karlikow, M., Goic, B., Saleh, M.-C., 2014.** RNAi and antiviral defense in *Drosophila*: setting up a systemic immune response. *Developmental & Comparative Immunology* 42, 85–92.
- Kassem, H.A., Osman, G., 2007.** Maternal transmission of Wolbachia in *Phlebotomus papatasi* (Scopoli). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 101, 435–440.
- Kaye, P., Scott, P., 2011.** Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology* 9, 604–615.
- Kelly, P.H., Bahr, S.M., Serafim, T.D., Ajami, N.J., Petrosino, J.F., Meneses, C., Kirby, J.R., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., Wilson, M.E., 2017.** The Gut Microbiome of the Vector *Lutzomyia longipalpis* Is Essential for Survival of *Leishmania infantum*. *mBio* 8.
- Kim, T., Kim, Y.-J., 2005.** Overview of innate immunity in *Drosophila*. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38, 121–127.
- Kumar, S., Christophides, G.K., Cantera, R., Charles, B., Han, Y.S., Meister, S., Dimopoulos, G., Kafatos, F.C., Barillas-Mury, C., 2003.** The role of reactive oxygen species on *Plasmodium* melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 14139–14144.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry & Molecular Biology Journal* 32, 1295–1309.
- Lawley, T.D., Walker, A.W., 2013.** Intestinal colonization resistance. *Immunology* 138, 1–11.

- Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007.** The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* 25, 697–743.
- Levashina, E.A., Ohresser, S., Bulet, P., Reichhart, J.M., Hetru, C., Hoffmann, J.A., 1995.** Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *European Journal of Biochemistry* 233, 694–700.
- Lindh, J.M., Borg-Karlson, A.-K., Faye, I., 2008.** Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: *Culicidae*) and oviposition response to bacteria-containing water. *Acta Tropica* 107, 242–250.
- Lindh, J.M., Terenius, O., Faye, I., 2005.** 16S rRNA Gene-Based Identification of Midgut Bacteria from Field-Caught *Anopheles gambiae* *Sensu Lato* and *A. funestus* Mosquitoes Reveals New Species Related to Known Insect Symbionts. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7217–7223.
- MacVicker, J.A.K., Moore, J.S., Molyneux, D.H., Maroli, M., 1990.** Honeydew sugars in wild-caught Italian *phlebotomine* sandflies (Diptera: *Psychodidae*) as detected by high performance liquid chromatography. *Bulletin of entomological research* 80, 339–344.
- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M.A., Hajikhani, S., Saeidi, Z., Akhavan, A.A., Gerami-Shoar, M., Shirazi, M.H., Yakhchali, B., Rassi, Y., Afshar, D., 2013.** Aerobic Microbial Community of Insectary Population of *Phlebotomus papatasi*. *Journal of Arthropod-Borne Diseases* 8, 69–81.
- McCarthy, C.B., Diambra, L.A., Rivera Pomar, R.V., 2011.** Metagenomic Analysis of Taxa Associated with *Lutzomyia longipalpis*, Vector of Visceral Leishmaniasis, Using an Unbiased High-Throughput Approach. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 5
- Meister, S., Agianian, B., Turlure, F., Relógio, A., Morlais, I., Kafatos, F.C., Christophides, G.K., 2009.** *Anopheles gambiae* PGRPLC-Mediated Defense

against Bacteria Modulates Infections with Malaria Parasites. *PLOS Pathogens* 5, e1000542.

Minard, G., Mavingui, P., Moro, C.V., 2013. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & Vectors* 6, 146.

Molina-Cruz, A., DeJong, R.J., Charles, B., Gupta, L., Kumar, S., Jaramillo-Gutierrez, G., Barillas-Mury, C., 2008. Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and Plasmodium. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 3217–3223.

Moll, R.M., Romoser, W.S., Modrakowski, M.C., Moncayo, A.C., Lerdthusnee, K., 2001. Meconial Peritrophic Membranes and the Fate of Midgut Bacteria During Mosquito (Diptera: *Culicidae*) Metamorphosis. *Journal of Medical Entomology* 38, 29–32.

Monteiro, C.C., Villegas, L.E.M., Campolina, T.B., Pires, A.C.M.A., Miranda, J.C., Pimenta, P.F.P., Secundino, N.F.C., 2016. Bacterial diversity of the American sand fly *Lutzomyia intermedia* using high-throughput metagenomic sequencing. *Parasites & Vectors* 9, 480.

Moore, J.S., Kelly, T.B., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Wallbanks, K.R., Molyneux, D.H., 1987. Honeydew sugars in wild-caught *Phlebotomus ariasi* detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). *Medical and Veterinary Entomology* 1, 427–434.

Moraes, C.S., Seabra, S.H., Castro, D.P., Brazil, R.P., de Souza, W., Garcia, E.S., Azambuja, P., 2008. *Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*: Ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects. *Experimental Parasitology* 118, 561–568.

Mueller, G.C., Xue, R.-D., Schlein, Y., 2011. Differential attraction of *Aedes albopictus* in the field to flowers, fruits and honeydew. *Acta Tropica* 118, 45–49.

- Muturi, E.J., Kim, C.-H., Bara, J., Bach, E.M., Siddappaji, M.H., 2016.** *Culex pipiens* and *Culex restuans* mosquitoes harbor distinct microbiota dominated by few bacterial taxa. *Parasites & Vectors* 9, 18.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993.** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695–700.
- Ngo, C.T., Aujoulat, F., Veas, F., Jumas-Bilak, E., Manguin, S., 2015.** Bacterial diversity associated with wild caught *Anopheles* mosquitoes from Dak Nong Province, Vietnam using culture and DNA fingerprint. *PloS One* 10, e0118634.
- Okhravi, N., Adamson, P., Matheson, M.M., Towler, H.M.A., Lightman, S., 2000.** PCR-RFLP–Mediated Detection and Speciation of Bacterial Species Causing Endophthalmitis. Invest. Ophthalmol. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41, 1438–1447.
- Osei-Poku, J., Mbogo, C.M., Palmer, W.J., Jiggins, F.M., 2012.** Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Molecular Ecology* 21, 5138–5150.
- Pumpuni, C.B., Beier, M.S., Nataro, J.P., Guers, L.D., Davis, J.R., 1993.** Plasmodium falciparum: Inhibition of Sporogonic Development in Anopheles stephensi by Gram-Negative Bacteria. *Experimental Parasitology* 77, 195–199.
- Pumpuni, C.B., J, D., M, K., Jr, D., Jc, B., 1996.** Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on Plasmodium sporogonic development. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54, 214–218.
- Ramirez, J.L., Souza-Neto, J., Cosme, R.T., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J.M., Dimopoulos, G., 2012.** Reciprocal Tripartite Interactions between the Aedes aegypti Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6, e1561.

- Rani, A., Sharma, A., Rajagopal, R., Adak, T., Bhatnagar, R.K., 2009.** Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiology* 9, 96.
- Sant'Anna, M.R., Diaz-Albiter, H., Aguiar-Martins, K., Al Salem, W.S., Cavalcante, R.R., Dillon, V.M., Bates, P.A., Genta, F.A., Dillon, R.J., 2014.** Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasites & Vectors* 7, 329.
- Sant'Anna, M.R.V., Darby, A.C., Brazil, R.P., Montoya-Lerma, J., Dillon, V.M., Bates, P.A., Dillon, R.J., 2012.** Investigation of the Bacterial Communities Associated with Females of *Lutzomyia* Sand Fly Species from South America. *PLOS ONE* 7, e42531.
- Sauer, S., Kliem, M., 2010.** Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 8, 74–82.
- Schleifer, K.H., 2009.** Classification of *Bacteria* and *Archaea*: past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology* 32, 533–542.
- Schlein, Y., Jacobson, R.L., 1999.** Sugar meals and longevity of the sandfly *Phlebotomus papatasi* in an arid focus of *Leishmania major* in the Jordan Valley. *Medical and Veterinary Entomology* 13, 65–71.
- Schlein, Y., Muller, G., 1995.** Assessment of plant tissue feeding by sand flies (Diptera: *Psychodidae*) and mosquitoes (Diptera: *Culicidae*). *Journal of Medical Entomology* 32, 882–887.
- Schlein, Y., Polacheck, I., Yuval, B., 1985.** Mycoses, bacterial infections and antibacterial activity in sandflies (*Psychodidae*) and their possible role in the transmission of leishmaniasis. *Parasitology* 90 (Pt 1), 57–66.
- Sinden, R.E., Billingsley, P.F., 2001.** Plasmodium invasion of mosquito cells: hawk or dove? *Trends in Parasitology* 17, 209–211.

- Straif, S.C., Mbogo, C.N.M., Toure, A.M., Walker, E.D., Kaufman, M., Toure, Y.T., Beier, J.C., 1998.** Midgut Bacteria in *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali. *Journal of Medical Entomology* 35, 222–226.
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V.V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S., Banfield, J.F., 2004.** Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428, 37–43.
- Uhlik, O., Strejček, M., Hroudová, M., Demnerová, K., Macek, T., 2013.** Identifikace a charakterizace bakterií s bioremediačním potenciálem - od kultivace k metagenomice. *Chemické Listy* 614–622.
- Vásquez, A., Ahrné, S., Pettersson, B., Molin, G., 2001.** Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for identification of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zeae* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Letters in Applied Microbiology* 32, 215–219.
- Vivero, R.J., Jaramillo, N.G., Cadavid-Restrepo, G., Soto, S.I.U., Herrera, C.X.M., 2016.** Structural differences in gut bacteria communities in developmental stages of natural populations of *Lutzomyia evansi* from Colombia's Caribbean coast. *Parasites & Vectors* 9.
- Vivero, R.J., Torres-Gutierrez, C., Bejarano, E.E., Peña, H.C., Estrada, L.G., Florez, F., Ortega, E., Aparicio, Y., Muskus, C.E., 2015.** Study on natural breeding sites of sand flies (Diptera: *Phlebotominae*) in areas of *Leishmania* transmission in Colombia. *Parasites & Vectors* 8, 116.
- Volf, P., Kiewegova, A., Nemec, A., 2002.** Bacterial colonisation in the gut of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera : Psychodidae): transtadial passage and the role of female diet. *Folia Parasitologica (Praha)* 49, 73–77.

- Wang, Y., Gilbreath, T.M., Kukutla, P., Yan, G., Xu, J., 2011.** Dynamic Gut Microbiome across Life History of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS ONE* 6.
- Wasserberg, G., Rowton, E.D., 2011.** Sub-additive effect of conspecific eggs and frass on oviposition rate of *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Journal of Vector Ecology* 36, S138–S143.
- Wu, M., Sugimura, Y., Taylor, D., Yoshiyama, M., 2013.** Honeybee Gastrointestinal Bacteria for Novel and Sustainable Disease Control Strategies. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development* 85–90.
- Xu, J., 2006.** Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology* 15, 1713–1731.
- Yadav, K.K., Bora, A., Datta, S., Chandel, K., Gogoi, H.K., Prasad, G.B.K.S., Veer, V., 2015.** Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. *Parasites & Vectors* 8, 641.
- Zouache, K., Raharimalala, F.N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L.H.R., Ravelonandro, P., Mavingui, P., 2011.** Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiology Ecology* 75, 377–389.